

LAW OFFICES
MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
ARLINGTON COURTHOUSE PLAZA I
SUITE 1400
2200 CLARENDON BOULEVARD
ARLINGTON, VIRGINIA 22201

TELEPHONE: (703) 243-6333
CABLE: USALAW
INT'L TELEX: 64191
TELECOPIER: (703) 243-6410

Atty's Docket No. PATWA-2

Applicant(s) : Heinz Peter VOLLMERS, Wuerzburg, Germany
Hans Konrad MUELLER-HERMELINK, Wuerzburg, Germany

For : SUBSTANZ ZUR GEWINNUNG HOCHWIRKSAMER TUMORARZNEIEN SOWIE
VERFAHREN

The Honorable Commissioner
of Patents and Trademarks
Washington, D.C. 20231

SUBMISSION OF APPLICATION UNDER 37 C.F.R. §1.53(i) IN GERMAN

Sir:

Herewith is the above-identified application for Letters Patent including:

Applicant(s) Name(s) : Heinz Peter VOLLMERS, Wuerzburg, Germany
Hans Konrad MUELLER-HERMELINK, Wuerzburg, Germany

Assignee (by unrecorded assignment) :

Pages of Application: Specification - 31
Claims - 5
Abstract - 1
Sheets of Drawings - 16

NO DECLARATION IS ATTACHED.

■ The benefit under 35 U.S.C. §119 is claimed of the filing date of:

German 198 59 248.5 filed December 22, 1998 AND
German 199 09 771.2 filed March 5, 1999

Respectfully submitted,

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.

By: _____
Anthony J. Zelano (Reg. No. 27,969)
Representative Capacity

MILLEN, WHITE, ZELANO & BRANIGAN, P.C.
Arlington Courthouse Plaza I
2200 Clarendon Boulevard, Suite 1400
Arlington, Virginia 22201
(703) 812-5311 [direct dial]
Internet Address: zelano@mwzb.com

Filed: December 22, 1999

AJZ/tal:K:\PAT\Parwa2\rule 53(f) transmittal.wpd

- 1 -

Substanz zur Gewinnung hochwirksamer Tumorarzneien sowie Verfahren

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von Antitumormitteln.

10

Beim Magenkarzinom handelt es sich um eine der weltweit häufigsten Krebsarten. Nach Lauren "The two histological main types of gastric carcinoma", Acta Path Microbiol Scand; 64:331-49, werden sie histologisch eingeteilt in diffuse Adenokarzinome und intestinale Adenokarzinome. Intestinale Magenkarzinome sind oft von chronischer Gastritis B begleitet und insbesondere von intestinalen Metaplasien, die als Vorläufer dysplastischer Veränderungen und von Magenkarzinomen betrachtet werden. Unterschiede zwischen diesen beiden Arten zeigen sich auch darin, daß Patienten mit Karzinomen des diffusen Typs oft der Blutgruppe A angehören, woraus auf den Einfluß genetischer Faktoren beim Krebsrisiko geschlossen werden kann, während Umweltfaktoren, z.B. eine Helicobacter pylori-Infektion, möglicherweise für die Entstehung von Karzinomen des intestinalen Typs von Bedeutung sind. Zwar ist eine abnehmende Häufigkeit der Magenadenokarzinome im Westen festzustellen, dafür treten sie aber nun vermehrt im Osten auf.

25

Die Therapie war bislang auf Gastrektomie und Lymphadenektomie beschränkt, aufgrund der auch dann noch schlechten Prognose besteht jedoch der Bedarf nach einer neuen begleitenden Therapie. Immunologische Studien haben gezeigt, daß auch in Fällen, in denen das Immunsystem maligne Zellen nicht wirksam bekämpfen kann. Zwar ist eine zelluläre und humorale Aktivität meßbar, aber nicht ausreichend, um die Tumorzellen zu zerstören. Ein wirkungsvoller Ansatz ist nun der, von der Immunantwort des Patienten stammende Antikörper zu isolieren, geeignet zu vermehren und

30

- 2 -

therapeutisch einzusetzen. So wurden beispielsweise von Patienten mit Lungen-, Ösophagus- und Dickdarmkrebs stammende Antikörper isoliert und davon humane monoklonale Antikörper abgeleitet, die z.B. direkt Differenzierung und das Wachstum der Tumorzellen beeinflussen, welche aber zumeist das Problem der Wechselwirkung mit anderen Tumoren oder gesunden Zellen haben.

Es ist bekannt, daß humane monoklonale SC-1-Antikörper Apoptose bei Magenkarzinomzellen auslösen können (Vollmers et al., Cancer 49 (1989), 2471-2476). Der Antikörper reagiert mit nahezu allen Adenokarzinomen vom diffusen Typ und etwa 20 % der Adenokarzinome vom intestinalen Typ (Vollmers et al., Cancer 76 (1995), 550-558; Vollmers et al., Cancer 79 (1997), 433-440). In klinischen Untersuchungen wurde gefunden, daß der Antikörper SC-1 in der Lage ist, eine tumorspezifische Regression und Apoptose bei primärem Magenkrebs ohne toxische Kreuzreaktivität gegenüber normalem Gewebe zu induzieren (Vollmers et al., Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552).

Apoptose ist der programmierte Zelltod, Selbstmord von Zellen, durch Fragmentation der DNA, Zellschrumpfung und Dilatation des endoplasmatischen Reticulums, gefolgt von Zellfragmentation und der Bildung von Membranvesikeln, den sog. apoptotischen Körpern. Apoptose, die physiologische Form des Zelltods, garantiert eine schnelle und saubere Entfernung unnötiger Zellen, ohne Entzündungsvorgänge oder Gewebsverletzungen auszulösen wie im Falle der Nekrose. Unter pathologischen Bedingungen dient sie auch zum Entfernen maligner Zellen, wie etwa Krebsvorläuferzellen. Sie kann durch verschiedenste Stimuli ausgelöst werden, wie etwa durch zytotoxische T-Lymphozyten oder Zytokine, wie Tumornekrosefaktor, Glukokortikoide und Antikörper. Sie ist die häufigste Todesursache eukaryontischer Zellen und kommt vor in der Embryogenese, Metamorphose und Gewebsatrophie. Apoptotische Rezeptoren an der Zelloberfläche, wie jene der NGF/TNF-Familie werden prädominant auf

- 3 -

Lymphozyten exprimiert, befinden sich aber auch auf verschiedenen anderen Zelltypen, weshalb sie sich nicht für eine Krebstherapie eignen. Insbesondere haben bei in-vivo-Tests Liganden und Antikörper für diese Rezeptoren zu Leberschäden geführt. Deshalb sind tumorspezifische
5 Rezeptoren mit apoptotischer Funktion besonders wichtig.

Der zelluläre Rezeptor des monoklonalen Antikörpers SC-1 war bisher nicht bekannt. Im Rahmen der zur vorliegenden Erfindung führenden Untersuchungen konnte dieser zelluläre Rezeptor identifiziert werden. Diese
10 Identifizierung gestaltete sich jedoch als schwierig. Einerseits reagiert der monoklonale Antikörper SC-1 bei der Westernblot-Analyse mit seinem Rezeptor nur unter ganz bestimmten Stringenzbedingungen. Andererseits findet man eine durch Denaturierungsartefakte hervorgerufene unspezifische Reaktion mit einer Reihe weiterer Proteine.

Bei dem zellulären Rezeptor des Antikörpers SC-1 handelt es sich um eine für Tumorzellen, insbesondere für Magenkarzinomzellen spezifische Isoform des Proteins CD55/DAF (Medof et al., J. Exp. Med. 160 (1984), 1558-1578; Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549; Bjorge et al., Int. J. Cancer 70 (1997), 14-25), die in normalem Gewebe nicht auftritt. Die
20 spezifischen Rezeptoreigenschaften dieser Isoform beruhen auf einer besonderen mit dem Proteinrückgrat über eine N-Verknüpfung verbundenen Glykostruktur. Der tumorspezifische Rezeptor kann in einem Screeningverfahren zur Identifizierung von spezifischen Bindepartnern eingesetzt werden.
25 Spezifische Bindepartner an den Rezeptor sind im Sinne der vorliegenden Erfindung solche Substanzen, die selektiv an eine tumorspezifische Glykostruktur, aber nicht signifikant an eine in normalen Zellen vorkommenden Glykostrukturen von CD55/DAF binden und vorzugsweise die Fähigkeit zur Apoptoseinduzierung besitzen. Diese spezifischen Bindepartner können für
30 die Herstellung von therapeutischen Mitteln zur Apoptoseinduzierung oder/und zur Tumorbekämpfung sowie zur Herstellung von diagnostischen Mitteln eingesetzt werden.

- 4 -

Die Bindung des Antikörpers SC-1 an die tumorspezifische N-verknüpfte Glykostruktur des CD55/DAF-Proteins induziert eine Tyrosinphosphorylierung von drei Proteinen und die Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8. Weiterhin wurde gefunden, daß die durch den Antikörper SC-1 induzierte Apoptose zu einer transienten Zunahme der Präsentation von tumorspezifisch N-glykosyliertem CD55/DAF an der Oberfläche von Tumorzellen führt. Diese erhöhte Präsentation kann durch eine erhöhte Expression oder/und durch eine erhöhte Glykosylierung hervorgerufen werden. Anschließend verschwindet das tumorspezifisch N-glykosylierte CD55/DAF-Protein von der Zellmembran durch Endocytose. Weiterhin wird eine Spaltung von Cytokeratin 18, eine erhöhte Expression von c-myc und eine Abnahme der Expression von Topoisomerase II α und somit eine mindestens partielle Zellzyklusarretierung beobachtet. Die durch SC-1 induzierten apoptotischen Prozesse führen nicht zu einer erhöhten Spaltung von Poly (ADP-Ribose)-Polymerase (PARP). Weiterhin findet man einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, das aus einem intrazellulären Ca²⁺-Pool freigesetzt wird. Eine Inhibierung der Ca²⁺-Freisetzung inhibiert die durch SC-1 induzierte Apoptose.

Ein erster Aspekt der Erfindung betrifft ein Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäureprimärstruktur von CD55/DAF, insbesondere der membrangebundenen Isoform DAF-B und eine für Tumorzellen spezifische Glykostruktur, insbesondere eine solche Glykostruktur, die mit dem monoklonalen Antikörper SC-1 reagiert. Ein derartiges, beispielsweise aus der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 (DSM ACC 201) oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien, wie 3051 (DSM ACC 270) oder 2957 (DSM ACC 240), oder aus primären Tumorzellen von Magenadenokarzinompatienten erhältliches Glykoprotein weist bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (unter reduzierenden Bedingungen) ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 82 kD auf. Neben diesem 82 kD Protein betrifft die Erfindung auch Varianten mit Deletionen, Insertionen oder/und Substitutionen in der Aminosäureprimärstruktur, die jedoch eine

- 5 -

dem natürlichen Protein analoge, d.h. tumorspezifische und vorzugsweise mit dem Antikörper SC-1 reaktive Glykostruktur besitzen.

Das erfindungsgemäße Glykoprotein kann erhalten werden, indem man
 5 Membranpräparationen aus Zellen, die ein Protein mit der gewünschten Glykostruktur exprimieren, z.B. aus Zellen der humanen Adenokarzinom-Zelllinie 23132 oder aus anderen humanen Adenokarzinomzelllinien herstellt und daraus das Glykoprotein durch chromatographische Verfahren z.B. durch Größenausschluß- oder/und Anionenaustauschchromatographie
 10 gewinnt. Die Herstellung der Membranpräparationen erfolgt vorzugsweise durch Lyse der Zellen in hypotonischem Puffer, Ultraschallbehandlung und anschließende Abtrennung der Zellkerne. Die Membranpräparationen können durch Zentrifugation aus dem verbleibenden Extrakt isoliert und durch chromatographische Methoden weiter aufgereinigt werden.

Das tumorspezifische CD55/DAF-Glykoprotein kann in einem Testverfahren eingesetzt werden, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an das tumorspezifische Glykoprotein, insbesondere an dessen Glykostruktur bestimmt wird. Das Testverfahren kann als Hochdurchsatz-Screeningver-
 20 fahren automatisiert werden. Hierzu kann das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, insbesondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 oder einer anderen humanen Adenokarzinomzelllinie, oder einer mit dem CD55-Gen transformierten heterologen eukaryontischen Zelle, z.B.
 25 einer Säugerzelle, die in der Lage ist, ein Protein mit der richtigen Glykostruktur zu erzeugen, eingesetzt werden. Als Kontrolle kann die Bindung der getesteten Substanz an ein Nichttumor-CD55/DAF-Glykoprotein untersucht werden, das aus normalen humanen Zellen oder Zelllinien erhältlich ist. Substanzen, die selektiv an das tumorspezifische Glykoprotein binden, sind
 30 zur Herstellung von therapeutischen oder/und diagnostischen Mitteln geeignet.

- 6 -

Vorzugsweise bestimmt man weiterhin die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptoseinduzierung, insbesondere bei Tumorzellen oder/und die Fähigkeit zur Induzierung einer über CD55/DAF vermittelten Phosphorylierungskaskade. Die Induzierung der Apoptose kann durch morphologische Zelluntersuchungen, durch Apoptosetestverfahren, z.B. durch einen Adhäsionstest (Vollmers et al., Cell 40 (1985), 547-557), durch Bestimmung der Keratin 1- und DNA-Fragmentierung, oder durch Proliferationstests wie dem MTT-Proliferationstest durchgeführt werden. Alternativ kann auch eine Bestimmung von Caspase-Aktivitäten, beispielsweise von Aktivitäten von Caspase-8 und/oder Caspase-3 oder eine Bestimmung der intrazellulären freien Calciumkonzentration erfolgen. Substanzen, die selektiv eine Apoptose von Tumorzellen induzieren, können als antitumorwirksame Substanzen eingesetzt werden. Die Induzierung der Phosphorylierungskaskade kann durch Verwendung von für Phosphorgruppen, z.B. Phosphotyrosin- oder/und Phosphoseringruppen spezifischen Antikörpern verfolgt werden.

Zweckmäßigerweise werden pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet. Hierzu zählen niedermolekulare pharmakologische Wirkstoffe, insbesondere jedoch Peptide, Peptidmimetika, Antikörper, z.B. polyklonale, monoklonale, oder rekombinante Antikörper, Antikörperfragmente oder Antikörperderivate. Weitere Beispiele für Liganden des CD55/DAF-Rezeptors sind Aptamere (NexStar Pharmaceuticals, 2860 Wilderness Place, Boulder, Colorado 80301, USA) und Spiegelmer (Noxxon Pharma, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin). Besonders bevorzugt sind beispielsweise rekombinante Antikörper wie etwa einzelkettige scFv-Antikörper, wie sie beispielsweise in Bakterienzellen wie etwa E.coli (Plückthun, Bio/Technology 9 (1991), 545-551 und darin zitierte Literaturstellen) oder auch in eukaryontischen Wirtszellen (Reff, Curr. Opinion Biotech. 4 (1993), 573-576 und Trill et al., Curr. Opinion Biotech 6 (1995), 553-560 oder darin zitierte Literaturstellen) erzeugt werden können. Weiterhin bevorzugt sind humane Antikörper, d.h. Antikörper mit humanen konstanten Domänen, wie

- 7 -

sie im menschlichen Körper, z.B. von Karzinompatienten, erzeugt werden, oder chimäre und humanisierte Antikörper, bei denen ursprünglich vorhandene nichthumane konstante Domänen oder/und Frameworkregionen durch entsprechende humane Bereiche ausgetauscht wurden. Beispiele für Antikörperfragmente sind Fab-, F(ab)₂- oder Fab'-Fragmente, wie sie durch proteolytische Spaltung von Antikörpern erhalten werden können. Zu den Antikörperderivaten zählen beispielsweise Konjugate von Antikörpern mit Markierungsgruppen oder/und Effektorgruppen, beispielsweise toxischen Substanzen wie etwa Cholera toxin oder Pseudomonas Exotoxin A oder radioaktiven Substanzen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das erfindungsgemäße Tumorglykoprotein CD55/DAF binden (mit Ausnahme des bereits bekannten monoklonalen Antikörpers SC-1) zur Herstellung von die Apoptose-induzierenden Mitteln oder/und zur Herstellung von Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik. Eine tumorspezifische oder tumorselektive Bindung im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet vorzugsweise, daß eine Substanz im immunhistochemischen Nachweis mit Tumorzellen, aber nicht signifikant mit anderen Zellen reagiert. Eine Induzierung der Apoptose im Sinne der vorliegenden Anmeldung bedeutet eine Erhöhung des Apoptoseindex, d.h. der Anteil apoptotischer Zellen nach Behandlung mit der Substanz gegenüber den proliferierenden Zellen ist höher als ohne Behandlung, vorzugsweise höher als 50%. Der spontane Apoptoseindex ohne Behandlung liegt deutlich unter 10%, wobei der Nachweis von proliferierenden Zellen über das Antigen Ki67 erfolgen kann.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose induzierenden Mitteln oder/und Antitumormitteln oder/und zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnostik, wobei man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur spezifischen Bindung an ein erfindungsgemäßes Glykoprotein testet und bei einem positiven Test-

- 8 -

ergebnis die Substanz in eine für pharmazeutischen Anwendungen geeignete Darreichungsform gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Trägerstoffen überführt.

5 Geeignete pharmazeutische Darreichungsformen enthalten den Wirkstoff in einer therapeutisch wirksamen Menge, insbesondere in einer antitumorwirksamen Menge. Die einem Patienten verabreichte Dosis und die Behandlungsdauer hängen von der Art und Schwere der Erkrankung ab. Geeignete Dosierungen für die Verabreichung von Antikörpern sind beispielsweise bei
10 Ledermann et al. (Int. J. Cancer 47 (1991), 659-664) und Bagshawe et al. (Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4 (1991), 915-922) beschrieben.

Der Wirkstoff kann alleine oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen
15 entweder gleichzeitig oder sequenziell verabreicht werden. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann neben dem Wirkstoff weitere pharmazeutisch übliche Substanzen enthalten. Die Zusammensetzung kann beispielsweise oral, nasal, pulmonal oder durch Injektion verabreicht werden. Oral verabreichbare Zusammensetzungen können in Form von Tabletten,
20 Kapseln, Pulvern oder Flüssigkeiten vorliegen. Durch Injektion verabreichbare Zusammensetzungen sind üblicherweise in Form einer parenteral verträglichen wässrigen Lösung oder Suspension.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bekämpfung von
25 Tumoren, wobei man einem Patienten, insbesondere einem humanen Patienten, eine antitumorwirksame Menge einer an eine erfindungsgemäßen Glykoprotein spezifisch bindefähigen Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1 verabreicht.

30 Bindepertner für tumorspezifische CD55/DAF-Proteine können auch für diagnostische Zwecke, z.B. zum Tumorimaging, eingesetzt werden. Geeignete Methoden für das Tumorimaging sind z.B. bei Steinstraesser et

- 9 -

al. (Clinical Diagnosis and Laboratory Medicine 2 ((1989), 1-11) beschrieben. Hierzu werden die Bindepartner vorzugsweise in Form von Konjugaten mit Markierungsgruppen, z.B. radioaktiven oder fluoreszierenden Markierungsgruppen eingesetzt. Alternativ können die Bindepartner auch
5 unkonjugiert mit der zu testenden Probe inkubiert und anschließend mit einem sekundären Bindungsreagenz angefärbt werden.

Ein Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Diagnose von Tumoren, wobei man eine zu testende Probe, z.B. eine Körperflüssigkeit
10 oder eine Gewebeprobe, oder einen Patienten mit einer an ein tumor-spezifisches CD55/DAF Glykoprotein bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhandensein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in der Probe oder im Patienten nachweist.

15 Noch ein Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zum Auslösen einer Phosphorylierungskaskade. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur transienten Erhöhung der
20 Präsentation von Tumorglykoprotein CD55/DAF an der Zelloberfläche, die durch eine erhöhte Glykosylierung oder/und Expression hervorgerufen werden kann. Anschließend verschwindet das tumorspezifische Glykoprotein von der Zelloberfläche. Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, welche selektiv an das Tumorglykoprotein
25 CD55/DAF binden, zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, können auch als Mittel zur Zellzyklusarretierung eingesetzt werden. Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, zur Induzierung von
30 apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von PARP umfassen. Die Substanzen können gegebenenfalls als Konjugate mit Markierungs- oder/und Effektorgruppen eingesetzt werden.

- 10 -

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Substanzen, die spezifisch an das Tumorglykoprotein CD55/DAF binden, insbesondere des Antikörpers SC-1 zur Induzierung von Apoptose in ruhenden Tumorzellen. Dieser Befund ist nach Kenntnisstand der Erfinder bisher noch für keine tumorspezifische Substanz bekannt gewesen.

Die das tumorspezifische Glykoprotein CD55/DAF bindenden Substanzen enthalten vorzugsweise multiple, d.h. mindestens zwei Bindungsstellen für CD55/DAF. Beispielsweise können die Substanzen drei, vier, fünf, sechs, sieben, acht, neun, zehn oder mehr Bindungsstellen enthalten, so daß bei Bindung an zellständiges tumorspezifisches CD55/DAF eine Quervernetzung entsteht. Um Substanzen mit multiplen Bindungsstellen zu erhalten, können Bindemoleküle gegebenenfalls quervernetzt werden. Die Quervernetzung kann beispielsweise mittels chemischer Kopplung, z.B. über bifunktionelle Linkermoleküle, oder über hochaffine Wechselwirkungen, z.B. Streptavidin/Biotin, erfolgen. Auch wenn es sich bei dem CD55/DAF-Bindemolekül beispielsweise um Antikörper, z.B. IgG oder IgM, handelt, die bereits mehrere Bindungsstellen enthalten, kann durch Quervernetzung z.B. über Anti-IgG- oder Anti-IgM-Antikörper noch eine Verbesserung der Apoptose-induzierung erreicht werden. Die Verwendung von quervernetzten Antikörpern ist daher bevorzugt.

Die Zelllinie 23132 ist von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, unter dem Aktenzeichen DSM ACC 201 erhältlich.

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen:

Figur 1: die Identifizierung von mit dem Antikörper SC-1 reaktiven Antigenen.

- 11 -

a: Aufreinigung von SC-1 Antigenen aus Membranextrakten der Magenkarzinomzelllinie 23132.

b: Sequenzierung eines als SC-1 Antigen identifizierten 82 kD Proteins durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektroskopie.

Figur 2: der Einfluß einer Spaltung von GPI-Ankern durch Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) auf eine Anfärbung mit SC-1. Unbehandelte Magenkarzinomzellen der Zelllinie 23132 angefärbt mit SC-1 (a) und Anti-EMA (c); mit PI-PLC behandelte Zellen angefärbt mit SC-1 (b) und Anti-EMA (d) (400 x Vergrößerung).

Figur 3: das Ergebnis eines MTT Test mit dem Antikörper SC-1 bei Magenkarzinomzellen. Kontrolle: unbehandelte Zellen; SC-1: mit SC-1 behandelte Zellen; SC-1, PIPLC: mit Phospholipase und anschließend mit SC-1 behandelte Zellen.

Figur 4: das Ergebnis einer Analyse von mit einem CD55-Antisense-Vektor transient transfizierten Zellen. Zellen, die mit einem Kontrollvektor transfiziert wurden, zeigen ein normales Anfärbungsmuster mit SC-1 (a) und Anti-CEA (c). In mit dem Antisense-Vektor transfizierten Zellen ist die Anfärbung mit SC-1 verringert (b), während keine Änderung bei Anfärbung mit Anti-CEA (d) zu erkennen ist.

Figur 5: das Ergebnis eines Klenow-Fragmentierungstests. Transfizierte Zellen zeigen keine Apoptose ohne Induzierung mit SC-1 (e) im Vergleich zu einer positiven Kontrolle (f). Nach Inkubation mit SC-1 zeigen die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen Apoptose (g), während die Mehrzahl der mit dem CD55

- 12 -

Antisense-Vektor transfizierten Zellen resistent gegenüber Apoptose ist (h).

Figur 6: eine quantitative Bestimmung der durch SC-1 induzierten Apoptose. Mit dem Kontroll- und dem CD-55 Antisense-Vektor transfizierte Zellen wurden mit SC-1 inkubiert und Cytospins dieser Zellen mit dem Klenow DNA Fragmentierungskit angefärbt. Die Prozentzahlen apoptotischer Zellen wurden von zwei verschiedenen Personen durch Zählung Apoptose-positiver und negativer Zellen in drei verschiedenen Feldern mit jeweils etwa 500 Zellen bestimmt.

Figur 7: die Wirkung eine Deglykosillierung auf die Bindung des Antikörpers SC-1.

- a: Tumorzellen mit Puffer Inkubiert und mit SC-1 angefärbt;
- b: mit N-Glykosidase und mit SC-1 inkubierte Zellen;
- c: mit Puffer und Anti-CD55 inkubierte Zellen und
- d: mit N-Glykosidase und Anti-CD55 inkubierte Tumorzellen.

Figur 8: Das Ergebnis eines MTT-Tests mit SC-1 bei der Magenkarzinom-Zelllinie 23132.

- a: Titration von SC-1;
- b: Quervernetzung von SC-1 mit Kaninchen-Anti-human IgM-Antikörpern;

Figur 9: die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1. An Punkt 1 erfolgte die Zugabe von SC-1 bzw. Kontrollantikörper. An Punkt 2 wurden die Zellen mit Ringerlösung gewaschen.

- 13 -

Figur 10: das Expressions- und Aktivitätsmuster der Caspasen 3 und 8 nach Induzierung mit SC-1.

- a: Westernblot-Analyse der Caspasen-3 und -8. Die Aktivierung von Caspase-3 aufgrund proteolytische Spaltung ist durch Auftreten des p20 Spaltprodukts zu erkennen.
- b: das Ergebnis einer Aktivitätsbestimmung von Caspase-8. Ein vierfacher Anstieg der Caspase-8 Aktivität wurde 20 Stunden nach Induzierung der Apoptose gefunden.

Figur 11: die Phosphorylierungsmuster der Zell-Linie 23132 nach Induzierung der Apoptose.

- a: Eine rasche Phosphorylierung von Tyrosinresten in Proteinen mit Molekulargewichten von etwa 110 kD und 60 kD sowie die Dephosphorylierung eines Serinrests in einem Protein mit etwa 35 kD wurde nach Induzierung der Apoptose mit SC-1 gefunden.
- b: Eine Zunahme der Phosphorylierung eines Thyrosinrestes in einem 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min wurde nach Induzierung der Apoptose gefunden.

Figur 12: eine Expressions- und Mutationsanalyse von p53.

- a: 5 min nach Induzierung der Apoptose durch SC-1 wurde eine starke Zunahme der mRNA Konzentration gefunden, während die hohen p53 Proteinkonzentrationen unverändert bleiben.
- b: eine Sequenzanalyse von p53 zeigte eine Mutation in Codon 273, die zu einem Aminosäureaustausch von Arg zu His führt.

- 14 -

Figur 13: eine Expressionsanalyse von p21.

Nach Induzierung der Apoptose wird eine Zunahme der p21 mRNA Konzentration gefunden.

Figur 14: eine Western Blot-Analyse von SC-1 induzierten Zellen.

- a: CD55/DAF Expression (Anfärbung mit SC-1)
- b: Spaltung von PARP (Anfärbung mit Anti-PARP-Antikörper)
- c: Anfärbung mit Anti-Topoisomerase II α -Antikörper als Marker für zelluläre Proliferation
- d: c-myc Expression (Anfärbung mit Anti-c-myc-Antikörper)

Figur 15: die Wirkung des Caspase-3 Inhibitors Ac-DEVD-CHO auf die SC-1-induzierte Apoptose.

Figur 16: den Nachweis einer tumorzellspezifischen Apoptose durch in situ Kernfärbung bewirkt durch Verabreichung des Antikörpers SC-1 an einem Primärtumor.

Figur 17: die Wirkung der Verabreichung des Antikörpers SC-1 auf einen Primärtumor.

- a: Biopsieprobe vor Verabreichung von SC-1 (in situ Färbung auf Apoptose)
- b: Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (in situ Färbung auf Apoptose)
- c: Biopsie vor Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse)
- d: Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 (histologische Regressionsanalyse).

- 15 -

Beispiele

1. Material und Methoden

1.1 Zellkultur

Für alle Tests wurde die etablierte Magenadenokarzinomzelllinie 23132 (Vollmers et al., Virchows Arch. B. Zell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. 63 (1993), 335-343) verwendet. Die Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (beide 1%) bis zur Subkonfluenz kultiviert. Für die beschriebenen Testverfahren wurden Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) vor der Anwendung gewaschen. Die humane Hybridomzelllinie SC-1 wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer Res. 49 (1989), 2471-2476) beschrieben hergestellt und kultiviert.

1.2 Aufreinigung des Antikörpers SC-1

Der humane monoklonale Antikörper SC-1 wurde aus Massenkulturen unter Verwendung von Kationenaustauschchromatographie gefolgt von Gelfiltration wie bei Vollmers et. al. (Oncology Reports 5 (1998), 35-40) beschrieben aufgereinigt.

1.3 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors

Zur Präparation von Membranproteinen wurden geerntete Zellen in hypotonischem Puffer (20 mM HEPES, 3 mM KCl, 3 mM $MgCl_2$) resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und 5 min sonifiziert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10.000 g, 10 min) pelletiert. Die Membranen wurden durch Zentrifugation (30 min, 100.000 g) pelletiert und in Membranlysepuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 0,1 mM EDTA, 1 M NaCl, 10% Glycerin und

- 16 -

und 1 % Triton X-100) resuspendiert. Allen Lösungen wurde Complete® Proteaseinhibitor (Boehringer Mannheim, Deutschland) zugesetzt.

Die Aufreinigung der Antigene erfolgte durch Säulenchromatographie unter Verwendung einer FPLC-Einheit (Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Für die Größenausschlußchromatographie wurde eine Pharmacia Superdex 200 Säule (XK16/60) mit 5 mg Membranproteinpräparation in Puffer A (100 mM Tris HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 40 mM NaCl, 1 % Triton X-100) beladen. Das Säuleneluat wurde fraktioniert und in einer Westernblot-Analyse auf Reaktion mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Positive Fraktionen wurden unter Verwendung von Puffer A auf eine MonoQ-Säule geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten unter Verwendung von Puffer B (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X100) fraktioniert und durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Anfärbung mit Coomassie bzw. Westernblot-Analyse untersucht. Positive Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

1.4 Präparation von Zell-Lysaten nach Induzierung mit SC-1

Die Zellline 23132 wurde auf 100 mm Zellkulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Der Antikörper SC-1 wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/ml für die jeweils angegebene Zeitdauer zugegeben. Dann wurden die Kulturplatten einmal mit PBS gewaschen und die Zellen wurden mit SDS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 6,8, 10 mM Dithiothreitol, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin) direkt lysiert. Die Zellrückstände wurden mit einem Gummischaber gesammelt.

1.5 Gelelektrophorese und Blots

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen und das Western-Blotting von Proteinen wurde unter Verwendung von

- 17 -

Standardprotokollen wie bei Vollmers et al. (Cancer 79 (1997), 433-440) beschrieben durchgeführt. Nitrozellulosemembranen wurden mit PBS unter Zusatz von 0,1 % Tween-20 und 2% Magermilchpulver oder 3 % Rinderse-
rumalbumin (zur Bestimmung der Phosphorylierung) blockiert und anschlie-
ßend eine Stunde lang mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Antikörper
wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt. SC-1 (human) 10 µg/ml
bzw. 15 µg/ml; Anti-Caspase-3 bzw. -8 (Ziege) (SantaCruz, Heidelberg,
Deutschland) 5 µg/ml, Streptavidin Anti-Phosphotyrosin-Konjugat (Klon PT-
66) 1:20.000 und Streptavidin Anti-Phosphoserin-Konjugat (Klon PSR-45)
1:30.000 (Sigma, München, Deutschland), Maus-Anti-Topoisomerase IIα-
Antikörper 1:1.000 (Neomarkers, Baesweiler, Deutschland), Anti-c-myc-
Antikörper 1:1.000 (Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) und Anti-PARP-
Antikörper 1:1.000 (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Die Sekundär-
antikörper Peroxidase-Kaninchen-Anti-Human-IgM-Konjugat oder Kaninchen-
Anti-Ziegen-Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) und Peroxidase-
konjugiertes Extravidin (Sigma) wurden mit dem SuperSignal Chemilumi-
neszenzkit von Pierce (KMF, St. Augustin, Deutschland) nachgewiesen.

1.6 Proteinsequenzierung

Eine Proteinbande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 82 kD wurde durch eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese isoliert und durch Anfärbung mit Coomassie sichtbar gemacht. Die p82-Bande wurde
im Gel mit Trypsin (Boehringer Mannheim, nichtmodifiziert, Sequenzierungs-
qualität) wie bei Shevchenko et al., (Anal. Chem. 68 (1996), 850-858)
beschrieben gespalten. Der nicht aufgetrennte Pool von tryptischen Peptiden wurde durch Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie wie von Wilm et al. (Nature 379 (1996), 466-469) beschrieben sequenziert. Die Sequen-
zierung erfolgte auf einem API III Triple Quadrupol Massenspektrometer (PE
Sciex, Ontario, Kanada). Die Sequenzen der Peptidfragmente wurden unter
Verwendung der Tandem-Massenspektrometriedaten assembliert und durch
Datenbankrecherchen den jeweiligen Proteinen zugeordnet.

- 18 -

1.7 RT-PCR

Die cDNA-Synthese aus Gesamt RNA der Tumorzellen 23132 erfolgte mit 5 µg Gesamt RNA unter Verwendung von M-MLV Reverser Transkriptase (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit 1,75 mM MgCl₂, 0,4 pM Primer, 200 µM von jedem dNTP und 1 U Taq Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt.

Es wurden folgende PCR-Produkte erzeugt:

CD55 (640 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von bp 382 bis 1022)
p53-Fragment 1 (850 bp Fragment aus dem Sequenzbereich von 91 bis 940) p53-Fragment 2 (800 bp aus dem Sequenzbereich von 492 bis 1294)

1.8 Klonierungsprozeduren

Die PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel unter Verwendung des Jetsorb Gelextraktionskits (Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland) aufgereinigt. Die Klonierung der PCR-Fragmente erfolgte mit dem pCR-Script Amp SK (+) Klonierungskit (Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

Die Klonierung des Antisense-Vektors pHOOK2-CD55-anti erfolgte durch Glätten des CD55-PCR-Produkts mit Pfu-Polymerase und Klonierung in den mit SmaI geschnittenen Expressionsvektor pHOOK2 (Invitrogen, Leek, Niederlande). Ein Klon mit Antisense Richtung der Insertion unter Kontrolle des P_{CMV}-Promotors wurde für die Antisense-Experimente ausgewählt.

1.9 DNA-Sequenzierung

Acht positive Klone wurden unter Verwendung des DyeDeoxy Termination Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems Inc., Weiterstadt, Deutschland)

- 19 -

sequenziert und dem automatisierten DNA Sequenzer ABIPrism 373 analysiert. Beide Stränge wurden unter Verwendung von T3 und T7 Primern sequenziert. Die Sequenzen wurden unter Verwendung der Computerprogramme DNASIS und BLAST analysiert.

5

1.10 Transfektion

Für Transfektionsexperimente wurden 2.5×10^7 abgelöste Zellen in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und in $400 \mu\text{l}$ TBS resuspendiert.

10

Nach Zugabe von $10 \mu\text{g}$ Plasmid DNA wurden die Zellen mit 240 V , 960 nF unter Verwendung eines Elektroporationsgeräts von BioRad (München, Deutschland) gepulst. 5×10^5 transfizierte Zellen wurden auf einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät und für 24 h wie zuvor beschrieben inkubiert. Die Apoptose wurde durch Zugabe von $50 \mu\text{g/ml}$ gereinigtem SC-1 Antikörper zum Wachstumsmedium induziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Trypsin behandelt und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

15

1.11 Phospholipasetest

Abgelöste und deletierte Zellen wurden RPMI-1640 mit Zusätzen resuspendiert und für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach dieser Erholungsperiode wurden 20 mU/ml PI-PLC (Boehringer Mannheim) zugegeben, und die Zellen für weitere 60 min inkubiert. Schließlich wurden die Zellen gewaschen und zur Herstellung von Cytospins verwendet.

25

1.12 Glycosidase-Test

Abgelöste und gewaschene Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert, dann gezählt und Cytospins hergestellt. Nach Lufttrocknung wurden die Cytospinpräparationen mit Aceton fixiert (10 min), gewaschen und mit $20 \mu\text{U/ml}$ O-Glykosi-

30

- 20 -

dase oder 5 mU/ml N-Glycosidase (Boehringer Mannheim) für 4 h bei 37°C inkubiert.

1.13 Immunhistochemische Anfärbung

5

Folgende Antikörper wurden für die immunhistochemische Anfärbung verwendet: Gereinigter Antikörper SC-1, Anti-CEA-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) Anti-EMA-Antikörper (Loxo, Dossenheim, Deutschland) und Anti-CD55-Antikörper (Biozol, Eiching, Deutschland). Die Acetonfixierung und Anfärbung der Cytospinpräparationen erfolgte wie von Vollmers et al. (Hum. Antibodies Hybridomas 7 (1996), 37-41) beschrieben.

10

Zur immunhistochemischen Anfärbung von apoptotischen Zellen wurden bis zur Subkonfluenz kultivierte Zellen mit gereinigtem Antikörper SC-1 (verdünnt auf 50 µg/ml) in vollständigem Wachstumsmedium für bis zu 96 h inkubiert. Adhärenzte und abgelöste Zellen wurden gesammelt, zentrifugiert und in vollständigem Wachstumsmedium resuspendiert. Nach einer Zellzählung wurden Cytospin-Präparate hergestellt und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Untersuchung der Spaltung von Cytokeratin 18 in vivo wurden Biopsien von Patienten vor Behandlung mit SC-1 und Gewebeschnitte nach Behandlung und Gastrektomie wie bei Vollmers et al., (Oncol. Rep. 5 (1998), 549-552) beschrieben entnommen.

15

20

Die Cytospins wurden mit Rinderserumalbumin (15 mg/ml) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 30 min blockiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 1 h mit SC-1-Überstand, M30 Cyto Death-Antikörper (Roche Biochemicals, Mannheim, Deutschland) oder Maus-Anti-Cytokeratin 18 Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) 1:15 verdünnt. Anschließend wurde für 30 min in PBS gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit Peroxidase-markiertem Kaninchen-Anti-Maus- oder Kaninchen-Anti-Human-Konjugat (DAKO) 1:25 verdünnt. Nach 30-minütigem Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung mit Diaminobenzidin (0.05 %) und Wasserstoff-

25

30

- 21 -

peroxid (0,02 %) für 3 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt und die Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

5 1.14 Apoptosetests

Cytospinpräparationen (5000 Zellen/Objektträger) wurden in Aceton fixiert und dann mit TBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit dem FragE1-Klenow DNA-Fragmentierungskit (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers angefärbt.

Ein ELISA zum Nachweis der Apoptose wurde unter Verwendung des Cell Death Detection® Kit (Roche Biochemicals) nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

15 1.15 MTT-Test

Der MTT-Proliferationstest (Carmichael et al., Cancer Res. 47 (1987), 936-942) zur Bestimmung der Apoptoseaktivität des Antikörpers SC-1 auf Magenkarzinomzellen wurde wie bei Vollmers et al. (Cancer 76 (1995), 550-558) beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte durch den mitochondrialen Hydroxylase-Test (Mossmann, J. Immunol. Meth. 65 (1983), 55-63). Aus der Absorption der mit SC-1 induzierten Zellen und der nicht mit SC-1 induzierten Kontrolle wurde der prozentuale Anteil von apoptotischen Zellen bestimmt (Vercammen et al., J. Exp. Med. 188 (1998), 919-930).

1.16 Caspase-3 und -8 Tests

Die Aktivierung von Caspase-8 und Caspase-3 wurde mit dem ApoAlert™ Caspase Fluoreszenz-Testkit (Clontech, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit $40 \mu\text{g/ml}$ SC-1 für 7 bzw. 20 h inkubiert.

Dann wurden die Zellen gesammelt, in Zell-Lysepuffer resuspendiert und die Caspaseaktivität nach Angaben des Herstellers bestimmt.

1.17 Bestimmung von intrazellulärem freien Calcium (Ca^{2+})

Die Bestimmung der intrazellulären freien Calciumkonzentration wurde unter Verwendung des Calcium-sensitiven Farbstoffs Fura-2-AM wie von Grykiewicz et al. (J. Biol. Chem. 260 (1985), 3440-3450) beschrieben bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer Fura-2-AM in einer Endkonzentration von 5×10^{-6} M enthaltenden Ringerlösung (122,5 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 0,8 mM MgCl_2 , 1 mM NaH_2PO_4 , 5,5 mM Glucose, 10 mM HEPES pH 7,4) für 15 min inkubiert. Nach Spülen wurden die Objektträger mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400-fache Vergrößerung) untersucht. Das Fluoreszenzsignal wurde bei 500 nm mit zwischen 334 und 380 nm alternierenden Anregungswellenlängen unter Verwendung einer 100-W Xenon-Lampe und einer automatischen Filterwechselvorrichtung (Zeiss, Deutschland) gemessen. Die Konzentration von intrazellulärem freiem Calcium wurde nach der Methode von Grynkiewicz et al. (supra) unter Annahme einer Dissoziationskonstante von 225 nmol/l berechnet. Die maximalen und minimalen Fluoreszenzverhältnisse (R_{max} und R_{min}) wurden nach Zugabe von Kalibrierungslösungen gemessen. R_{max} wurde nach Zugabe einer Ringerlösung mit 3 mM Ca^{2+} und 10^{-6} M Ionomycin bestimmt. R_{min} wurde in Gegenwart einer Ca^{2+} freien Ringerlösung mit 3 mM EGTA und 10^{-6} M Ionomycin bestimmt.

1.18 Inhibierung der intrazellulären Calciumfreisetzung

Zellen wurden einmal mit phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen und für 24 h in Calcium-freiem DMEM-Medium ohne fötalem Kälberserum (FCS) gewaschen. Dann wurde aufgereinigter SC-1-Antikörper bis zu einer Endkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben. Als Kontrolle wurden die gleichen Zellen ohne SC-1 verwendet. Die Zellen wurden in einem

- 23 -

befeuchteten Inkubator für weitere 24 oder 48 h inkubiert und dann mit 3 % Glutaraldehyd fixiert. Die Zellkulturplatten wurden dann mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf morphologische Veränderungen untersucht.

2. Ergebnisse

2.1 Aufreinigung des SC-1-Rezeptors CD55

Bei Westernblot-Analyse von Extrakten aus Gesamtzell-Lysaten der Magenkarzinomzelllinie 23132, die unter Niedrigsalzbedingungen (100 mM NaCl) hergestellt worden waren, reagierte der Antikörper SC-1 mit einem Protein mit einer relativen Molekularmasse von etwa 50 kD. Durch Änderung der Stringenz (1 M NaCl) und unter Verwendung von Membranpräparationen konnten weitere Proteine mit etwa 70 kD und etwa 82 kD nachgewiesen werden (Figur 1a, Spur 1). Diese Proteine wurden aus Membranfraktionen isoliert und durch sequenzielle Größenausschluß- und Anionenaustauschchromatographie gereinigt (Figur 1a, Spuren 2, 3). Die Moleküle wurden aus SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und sequenziert.

Das 50 kD Protein wurde als Dihydrolipoamidsuccinyltransferase (Genbank-Zugriffsnr. L37418) und das 70 kD Protein als das humane Lupus p70 Autoantigenprotein (Genbank-Zugriffsnr. J04611) identifiziert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um zytoplasmatische bzw. nukleäre Antigene. Da der Antikörper SC-1 in immunhistochemischen Untersuchungen nur an Zelloberflächenantigene bindet, ist die Reaktivität vermutlich auf unspezifische Bindung aufgrund der Proteindenaturierung während der Westernblot-Analyse zurückzuführen.

Das 82 kD Protein wurde als CD55 (DAF, Genbank-Zugriffsnr. M31516, Figur 1b, Abschnitte 1 und 2) identifiziert. CD55 existiert beim Menschen in zwei genetisch bestimmten Isoformen (sekretiertes DAF-A und mem-

- 24 -

brangebundenes DAF-B) die durch differentielles Spleißen erzeugt werden (Caras et al., Nature 325 (1987), 545-549). Durch RT-PCR-Analyse wurde festgestellt, daß die Zelllinie 23132 nur die membranverankerte DAF-B Isoform exprimiert.

2.2 Phospholipase-Behandlung

Durch immunhistochemische Untersuchungen und im MTT-Proliferationstest wurde der Einfluß einer Abspaltung des Glykosidphosphatidylinositol (GPI)-Ankers auf die Bindung von SC-1 analysiert. Hierzu wurde der GPI-Anker durch Inkubation mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) abgespalten. Cytospins von mit PI-PLC behandelten und unbehandelten Zellen wurden immunhistochemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-EMA (Epithelialmembran-Antigen) angefärbt. Ein Vergleich mit unbehandelten Zellen (Figur 2a) zeigt einen Verlust der Anfärbungsintensität bei mit PI-PLC-behandelten und SC-1 angefärbten Zellen (Figur 2b). Bei Anfärbung mit Anti-EMA (Figur 2c, d) wurde kein Unterschied in der Anfärbung gefunden, was darauf hinweist, daß die PI-PLC-Behandlung keine Wirkung auf nicht GPI-verankerte Membranproteine hat. Beim MTT-Test führte eine Behandlung von Zellen mit Phospholipase C zu einer signifikanten Abnahme ($p \leq 0,05$) der apoptotischen Zellen (Figur 3).

2.3 Transfektion mit Antisense-CD55 RNA

Die Zelllinie 23132 wurde mit dem CD55 Antisense-Vektor pHOOK2-CD55anti und dem Kontrollvektor pHOOK2 durch Elektroporation transient transfiziert. Zuerst wurden Cytospins von transfizierten Zellen immunhistochemisch mit SC-1, Anti-CD55 und Anti-CEA (Carcino-embryonales Antigen) angefärbt. Die mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen zeigten eine intensive Anfärbung mit SC-1 und CEA (Figur 4a, c). Bei mit dem CD55 Antisense-Vektor angefärbten Zellen wurde fast keine Anfärbung mit SC-1 gefunden (Figur 4b). Die Anfärbung mit Anti-CEA-Antikörper zeigte, daß das

- 25 -

Expressionsmuster des (auch GPI-verankerten) CEA nicht durch die Transfektion mit dem Antisense-Vektor beeinflusst wird. Folglich wurde die Expression von CD55 spezifisch aufgrund der Expression der Antisense RNA reduziert.

5

Um zu analysieren, ob die Expression von Antisense-CD55 RNA auch die SC-1 induzierte Apoptose hemmt, wurden die Zellen einen Tag nach der Transfektion mit und ohne 30 µg/ml SC-1 für eine Dauer von 24 h inkubiert. Cytospins von mit dem Antisense-Vektor und dem Kontrollvektor transfizierten Zellen wurden mit dem FragE1 Klenow DNA Fragmentierungskit zum Nachweis einer durch Apoptose induzierten DNA-Fragmentierung angefärbt. Während mit beiden Plasmiden behandelte untransfizierte Zellen nahezu keine spontane Apoptose zeigen (Figur 5e), findet man nach Inkubation mit SC-1 eine deutliche Abnahme bei der Apoptose von mit dem CD55 Antisense-Vektor transfizierten Zellen (Figur 5g) im Vergleich zu mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (Figur 5h).

10

15

Eine quantitative Bestimmung zeigte, daß spontane Apoptose in transfizierten 23132 Zellen mit einer Häufigkeit von 6% auftrat, während nach Inkubation mit SC-1 85% der mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen eine Apoptose zeigten. Diese apoptotische Reaktion wurde durch Transfektion mit dem CD55 Antisense-Vektor auf 21% verringert (Figur 6).

20

2.4 Glykosidasebehandlung

25

Der Einfluß einer Proteindeglykosilierung auf die Bindung von SC-1 an die Zell-Linie 23132 wurde durch Inkubation von Cytospin-Präparaten mit O- und N-Glykosidasen vor der immunhistochemischen Anfärbung untersucht. Eine Behandlung von Zellen mit N-Glykosidase führte zu einer signifikanten Abnahme der SC-1 Anfärbung (Figur 7b), während eine Anfärbung mit Anti-CD55, der den Proteinanteil in der SCR3 Region erkennt, nicht durch Proteindeglykosilierung beeinflusst wurde (Figur 7d). Eine Inkubation mit

30

- 26 -

Phosphatpuffer und eine Behandlung mit O-Glycosidase hatte keine Wirkung auf die SC-1 Bindung. Dies zeigt, daß die Spezifität von SC-1 in N-verknüpften Zuckerresten und nicht in der Primärproteinsequenz lokalisiert sein muß.

2.5 Quervernetzung von CD55/SC-1

Die Zellen wurden 24 h mit zunehmenden Mengen an SC-1 inkubiert um die optimale apoptotische Aktivität von SC-1 zu bestimmen (Figur 8a). Dann erfolgte Quervernetzung bei einer Konzentration von 40 µg/ml SC-1 mit Kaninchen-Anti-Human IgM. Nach Inkubation für 48 h wurde ein 47% höherer Anteil an toten Zellen als bei mit SC-1 inkubierten Kontrollzellen gefunden (Figur 8b).

2.6 Calciumspiegel

Um zu untersuchen, ob die durch SC-1 induzierte Apoptose mit Änderungen des Calciumspiegels einhergeht, wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration der Zelllinie 23132 nach Induktion mit SC-1 und Kontrollantikörper (unspezifisches humanes IgM) bestimmt. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration etwa 1 min nach Zugabe des SC-1 Antikörpers gefunden werden, während der Kontrollantikörper keinen Einfluß hatte (Figur 9).

2.7 Caspase-Aktivität

Durch Westernblot-Analyse wurde gefunden, daß die Caspasen-3 und -8 nach Induzierung der Zelllinie 23132 mit SC-1 nach oben reguliert werden (Figur 10a). Eine die Aktivierung von Caspasen hervorrufoende proteolytische Spaltung wurde für Caspase-3 durch Identifizierung des Spaltprodukts p20 nachgewiesen (Figur 10a). Bei Caspase-8 wurde ein vierfacher Anstieg der Aktivität 20 h nach der Induzierung mit SC-1 gefunden, was auf eine

- 27 -

wesentliche Beteiligung dieser Caspase beim Apoptose-Prozess hinweist (Figur 10b).

Die Zugabe des spezifischen Caspase-3-Inhibitors AC-DEVD-CHO (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) zeigte überraschenderweise mit steigender Konzentration eine Zunahme der Apoptose bei Bestimmung mit dem Cell Death Detection® Kit (Figur 15).

2.8 Proteinphosphorylierung

Das Phosphorylierungsmuster nach Induzierung der Zellen mit 40 µg/ml SC-1 Antikörper wurde durch Westernblot-Analyse von cytoplasmatischen und Membranextrakten untersucht. Dabei wurde eine frühe Tyrosinphosphorylierung von 110 kD und 60 kD Proteinen 30 bis 60 sec nach Induzierung der Apoptose gefunden (Figur 11). Das 60 kD Protein wurde nur im Cytoplasma gefunden, während das 110 kD Protein sowohl im Plasma als auch im Membranextrakt nachweisbar war. Weiterhin wurde eine langsame Tyrosinphosphorylierung eines cytoplasmatischen 75 kD Protein mit einem Maximum nach 10 min sowie das vollständige Verschwinden der Serinphosphorylierung eines 35 kD Proteins 10 min nach Induzierung gefunden.

2.9 Expression und Sequenzierung von p53

Um die Rolle von p53 bei SC-1 induzierter Apoptose zu untersuchen, wurde die Häufigkeit der mRNA durch RT-PCR und des Genprodukts durch Westernblot-Analyse nach Induzierung bestimmt. Dabei wurde ein deutlicher Anstieg der mRNA-Konzentration gefunden. Auf Proteinebene wurde jedoch eine konstante und nicht signifikant geänderte hohe Konzentration des p53 Genprodukts gefunden (Figur 12a).

Durch Amplifizierung von zwei p53 Fragmenten aus cDNA mit spezifischen Primern, Klonierung der PCR-Fragmente und Sequenzierung von acht Klonen

- 28 -

wurde die DNA-Sequenz von p53 in der Zelllinie 23132 bestimmt. Alle Klone mit das Exon 8 überspannenden Insertionen zeigten eine Mutation in Kodon 273, die zu einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin führte (Figur 12b). Dies ist eine dominant negative Mutation, die häufig in Magenadenokarzinomen auftritt.

2.10 Expression von p21

Das Protein p21 ist ein mit der Expression von p53 assoziiertes Molekül. Ein Test der Expression von p21 in der Magenkarzinomzelllinie 23132 nach Behandlung mit SC-1 ergab einen Anstieg nach 5 min gefolgt von einer Verringerung nach 60 min (Figur 13).

2.11 Expression von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose

Es wurde das Expressionsmuster von CD55/DAF nach Induzierung der Apoptose durch 50 µg/ml SC-1 mittels immunhistochemischer Anfärbung von Cytospin-Präparationen mit dem Antikörper SC-1 untersucht. Während nichtinduzierte Zellen eine leichte Membrananfärbung mit dem Antikörper SC-1 aufweisen, zeigten mit SC-1 induzierte Zellen eine intensive Membrananfärbung 12 h nach Induzierung der Apoptose. Dies weist auf eine Erhöhung der CD55/DAF-Präsentation an der Zelloberfläche nach Bindung der Antikörper an die Zellen hin. Diese Membrananfärbung verschwindet nach 48 h, und eine diffuse cytoplasmatische Anfärbung ist erkennbar. Diese Anfärbung wird auch nach 96 h mit verringerter Intensität gefunden. Die Zunahme der CD55/DAF-Expression wurde auch bei einer Western Blot-Analyse mit Membranextrakten von apoptotischen Zellen nach SC-1-Induzierung gefunden. Während in nichtinduzierten Zellen CD55/DAF nicht nachweisbar ist, nimmt die CD55/DAF-Expression 1 h bis 6 h nach Induzierung zu. Nach 24 h nimmt die Expression von CD55/DAF ab, ist aber immer noch höher als in nichtinduzierten Zellen (Figur 14a).

- 29 -

2.12 Spaltung von Cytokeratin 18

Der Abbau von apoptotischen Zellen geht einher mit der proteolytischen Spaltung von Cytokeratin 18. Die Spaltung von Cytokeratin 18 in der Zelllinie 23132 nach SC-1 induzierter Apoptose sowie in Primärtumoren von Patienten, die mit 20 mg SC-1 48 h vor einer Tumorsektion behandelt worden waren, wurde untersucht. Eine M30 Cyto Death-Anfärbung zeigte eine geringe Menge apoptotischer Zellen ohne Induzierung von Apoptose, während die Anzahl apoptotischer Zellen bis 96 h zunimmt.

2.13 Molekulare Analyse der SC-1-Apoptose

Im Einklang mit den immunhistochemischen Anfärbungen zeigte die biochemische Analyse eine Zunahme der CD55/DAF-Moleküle, gefolgt von einer leichten Abnahme nach 24 h Inkubation mit SC-1 (Figur 14a). Die Spaltung von PARP wurde durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von Gesamtzellextrakten aus SC-1 induzierten Zellen und murinem Anti-PARP-Antikörper untersucht. In fünf unabhängigen Experimenten wurde keine Spaltung von PARP gefunden, die sich durch das Auftreten eines 85 kD Spaltungsprodukts (Lazebnik et al., Nature 371 (1994), 346-347) nachweisen lassen würde (Figur 14b).

Um Veränderungen im Zellzyklus nach Induzierung der Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression der Topoisomerase II α durch Western Blot-Analyse bestimmt. Die Topoisomerase II α ist ein Schlüsselenzym im Zellzyklus, das bei der DNA-Replikation beteiligt ist (Watt und Hickson, Biochem. J. 303 (1994), 681-695). Die verringerte Expression der Topoisomerase II α nach SC-1 induzierter Apoptose zeigt daher eine Zellzyklusarretierung für mindestens einen Teil der Zellen (Figur 14c).

Der Transkriptionsfaktor c-myc ist in verschiedenen apoptotischen Prozessen beteiligt und kann durch Transfektion in Zellen eine Apoptose

- 30 -

induzieren (Evan et al., Cell 69 (1992), 119-128). Eine Untersuchung des Expressionsmusters von c-myc nach SC-1 induzierter Apoptose ergab eine erhöhte Expression 15 min nach Induzierung der Apoptose gefolgt von einer Abnahme nach 4 h (Figur 14d).

5

2.14 Wirkung einer Verringerung der extrazellulären und intrazellulären Calciumkonzentration auf die Apoptose

Es wurde untersucht, ob Ca^{2+} -Ionen aus dem Zellkulturmedium aufgenommen werden oder aus intrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs freigesetzt werden. Zur Bestimmung, ob Ca^{2+} aus dem Kulturmedium aufgenommen wird, wurden die Zellen für 24 h in Serum- und Ca^{2+} -freiem DMEM-Medium inkubiert. Dann wurde gereinigter SC-1-Antikörper auf eine Endkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und weitere 24 h inkubiert. Die Zellen wurden dann in 3 % Glutaraldehyd fixiert und in einem umgedrehten Lichtmikroskop untersucht. Verglichen mit Kontrollzellen (nicht mit SC-1 induziert) zeigten SC-1 induzierte Zellen morphologische, für eine Apoptose charakteristische Veränderungen, vergleichbar mit Zellen, die mit SC-1 in RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % FCS inkubiert worden waren.

15

Der Einfluß von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Reservoirs wurde durch Inkubation von Zellen (kultiviert in serumfreiem DMEM-Medium) für 5 h mit 50 μM des zellpermeablen Chelators BAPTA (Alexis Biochemicals, Grünberg, Deutschland) untersucht. Die Zellen wurden für 24 h mit 40 $\mu\text{g/ml}$ gereinigtem SC-1 inkubiert. Es konnten keine erkennbaren Veränderungen in der Zellmorphologie beobachtet werden, was darauf hinweist, daß keine Apoptose induziert wurde. Auch durch ELISA konnte eine durch BAPTA bewirkte Hemmung der Apoptose gefunden werden.

20

30

- 31 -

2.15 Nachweis von Apoptose in Primärtumoren

Die Verabreichung des Antikörpers SC-1 an Magenkarzinom-Patienten führte zu einer deutlich erkennbaren tumorzellspezifischen Apoptose, wie durch in situ Kernfärbung nachgewiesen wurde (Figur 16). Während in Tumorbiopsien, die vor der Verabreichung von SC-1 entnommen wurden, keine Apoptose (Figur 17a) bzw. das Vorhandensein eines intakten Tumors ohne Regression (Figur 17c) gefunden wurde, zeigte der Primärtumor nach Verabreichung von SC-1 starke Apoptose (Figur 17b) bzw. eine starke Regression (Figur 17d).

- 32 -

Patentansprüche

1. Glykoprotein umfassend mindestens einen Abschnitt der Aminosäureprimärstruktur von CD55 und eine tumorspezifische Glykostruktur.
2. Glykoprotein nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Glykostruktur mit dem monoklonalen Antikörper SC-1 reagiert.
3. Glykoprotein nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß es bei SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ein scheinbares Molekulargewicht von 82 kD aufweist.
4. Verfahren zur Gewinnung eines Glykoproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Membranpräparationen aus Zellen der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 herstellt und daraus das Glykoprotein durch Größenausschluß- und/oder Anionenaustauschchromatographie gewinnt.
5. Verwendung eines Glykoproteins nach einem der Ansprüche 1 bis 3 in einem Testverfahren, bei dem die Bindefähigkeit einer Substanz an das Glykoprotein bestimmt wird.
6. Verwendung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Bindefähigkeit an die Glykostruktur bestimmt wird.

- 33 -

7. Verwendung nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Apoptose-induzierung,
insbesondere bei Tumorzellen bestimmt wird.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Fähigkeit der getesteten Substanz zur Induzierung einer über
das Glykoprotein CD55 vermittelten Phosphorylierungskaskade
bestimmt wird.
9. Verwendung nach Anspruch 5 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Glykoprotein in isolierter Form, als Zellextrakt, insbesondere
als Membranpräparation oder in Form vollständiger Zellen, ins-
besondere der humanen Adenokarzinomzelllinie 23132 eingesetzt
wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 9 zur Identifizierung
von spezifisch an Tumorzellen bindefähige Substanzen.
11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Identifizierung von Mitteln zur
Tumordiagnostik oder/und Tumorthherapie.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 5 bis 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß pharmakologisch verträgliche Substanzen getestet werden.

- 34 -

13. Verwendung nach Anspruch 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß die getesteten Substanzen aus Peptiden, Peptidmimetika,
Antikörpern, Antikörperfragmenten und Antikörperderivaten ausge-
wählt werden.
14. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von die Apoptose induzierenden
Mitteln.
15. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Antitumormitteln.
16. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, mit Ausnahme des monoklona-
len Antikörpers SC-1, zur Herstellung von Mitteln zur Tumordiagnos-
tik.
17. Verfahren zur Bereitstellung von die Apoptose induzierenden Mitteln,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur
spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche
1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in
eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform
gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-
stoffen überführt.

- 35 -

18. Verfahren zur Bereitstellung von Antitumormitteln,
dadurch gekennzeichnet,

daß man eine potentiell wirksame Substanz auf ihre Fähigkeit zur
spezifischen Bindung an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche
1 bis 3 testet und bei einem positiven Testergebnis die Substanz in
eine für pharmazeutische Anwendungen geeignete Darreichungsform
gegebenenfalls zusammen mit üblichen Hilfs-, Zusatz- und Träger-
stoffen überführt.

19. Verfahren zur Bekämpfung von Tumoren,
dadurch gekennzeichnet,

daß man einem Patienten eine antitumorwirksame Menge einer an ein
Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 spezifisch bindefähigen
Substanz mit Ausnahme des monoklonalen Antikörpers SC-1
verabreicht.

20. Verfahren zur Diagnose von Tumoren,
dadurch gekennzeichnet,

daß man eine zu testende Probe oder einen zu testenden Patienten
mit einer an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3
spezifisch bindefähigen Substanz in Kontakt bringt und das Vorhan-
densein, die Lokalisierung oder/und die Menge des Glykoproteins in
der Probe oder im Patienten nachweist.

21. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Auslösen einer Phosphory-
lierungskaskade in Tumorzellen.

22. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach
einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur transienten Erhöhung der
CD55/DAF-Präsentation auf Membranen von Tumorzellen.

- 36 -

23. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von apoptotischen Prozessen, die keine Spaltung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) umfassen.

5

24. Verwendung von Substanzen, die spezifisch ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zum Induzieren einer Zellzyklusarretierung in Tumorzellen.

10

25. Verwendung von Substanzen, die spezifisch an ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 binden, zur Induzierung von Apoptose bei ruhenden Tumorzellen.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 25,

15

dadurch gekennzeichnet,

daß die spezifisch bindefähige Substanz den Antikörper SC-1 umfaßt.

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 26,

dadurch gekennzeichnet,

20

daß die Substanzen in Form von Konjugaten mit Markierungs- oder Effektorgruppen eingesetzt werden.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 bis 27,

dadurch gekennzeichnet,

25

daß die Substanzen multiple Bindungsstellen für ein Glykoprotein nach einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen.

29. Verwendung nach Anspruch 28,

dadurch gekennzeichnet,

30

daß die spezifisch bindefähigen Substanzen quervernetzt werden.

- 37 -

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Substanz sowie ein Verfahren zur Gewinnung von
Antitumormitteln.

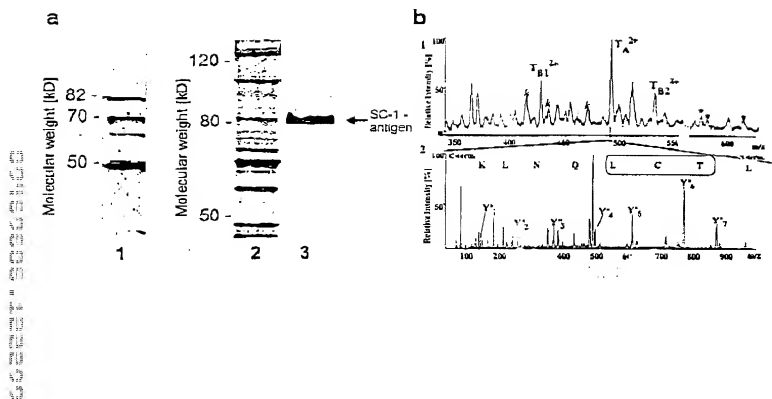
10

vd/ANM20047PWO 21. Dezember 1989

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046
1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121
1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239
1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298
1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357
1358
1359
1360
1361
1362
1363
1364
1365
1366
1367
1368
1369
1370
1371
1372
1373
1374
1375
1376
1377
1378
1379
1380
1381
1382
1383
1384
1385
1386
1387
1388
1389
1390
1391
1392
1393
1394
1395
1396
1397
1398
1399
1400
1401
1402
1403
1404
1405
1406
1407
1408
1409
1410
1411
1412
1413
1414
1415
1416
1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536
1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770
1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829
1830
1831
1832
1833
1834
1835
1836
1837
1838
1839
1840
1841
1842
1843
1844
1845
1846
1847
1848
1849
1850
1851
1852
1853
1854
1855
1856
1857
1858
1859
1860
1861
1862
1863
1864
1865
1866
1867
1868
1869
1870
1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911
1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952
1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011
2012
2013
2014
2015
2016
2017
2018
2019
2020
2021
2022
2023
2024
2025
2026
2027
2028
2029
2030
2031
2032
2033
2034
2035
2036
2037
2038
2039
2040
2041
2042
2043
2044
2045
2046
2047
2048
2049
2050
2051
2052
2053
2054
2055
2056
2057
2058
2059
2060
2061
2062
2063
2064
2065
2066
2067
2068
2069
2070
2071
2072
2073
2074
2075
2076
2077
2078
2079
2080
2081
2082
2083
2084
2085
2086
2087
2088
2089
2090
2091
2092
2093
2094
2095
2096
2097
2098
2099
2100
2101
2102
2103
2104
2105
2106
2107
2108
2109
2110
2111
2112
2113
2114
2115
2116
2117
2118
2119
2120
2121
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129
2130
2131
2132
2133
2134
2135
2136
2137
2138
2139
2140
2141
2142
2143
2144
2145
2146
2147
2148
2149
2150
2151
2152
2153
2154
2155
2156
2157
2158
2159
2160
2161
2162
2163
2164
2165
2166
2167
2168
2169
2170
2171
2172
2173
2174
2175
2176
217

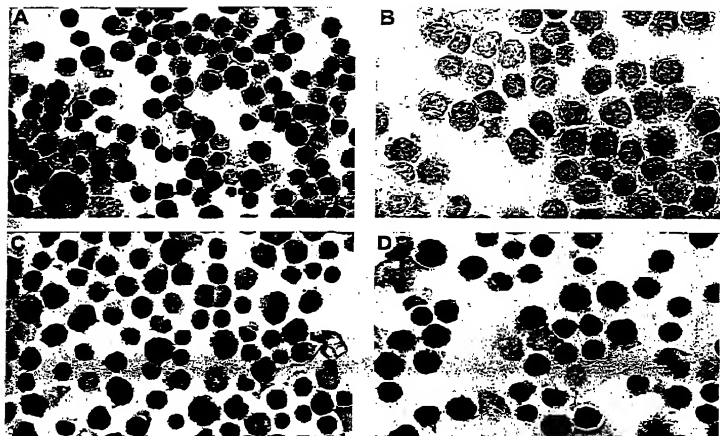
1/16

Figur 1



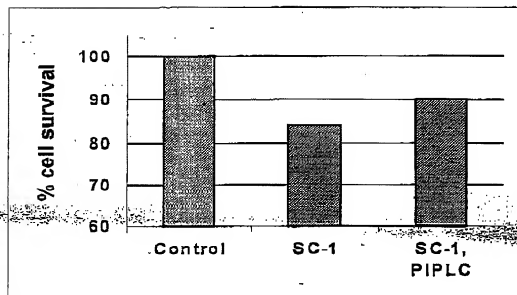
2/16

Figur 2



3/16

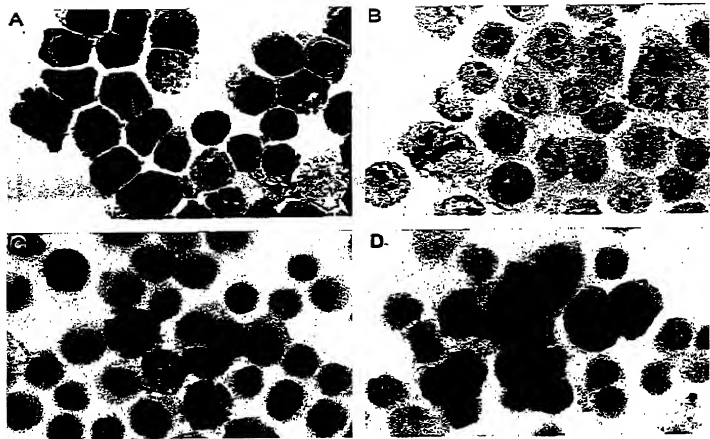
Figur 3



Phospholipase

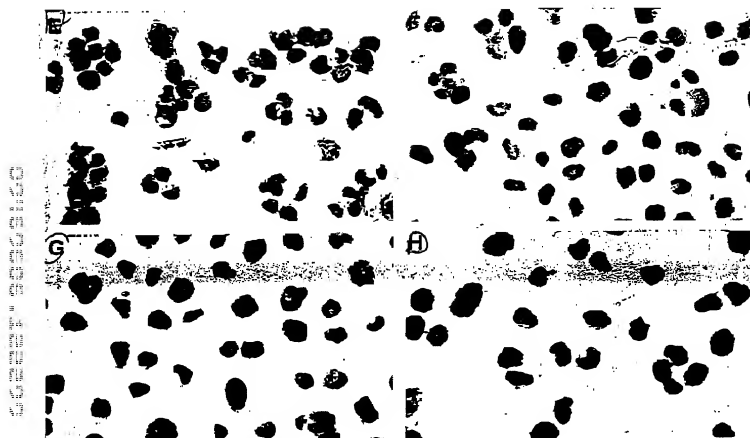
4/16

Figur 4



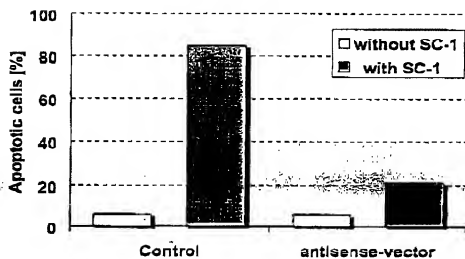
5/16

Figur 5



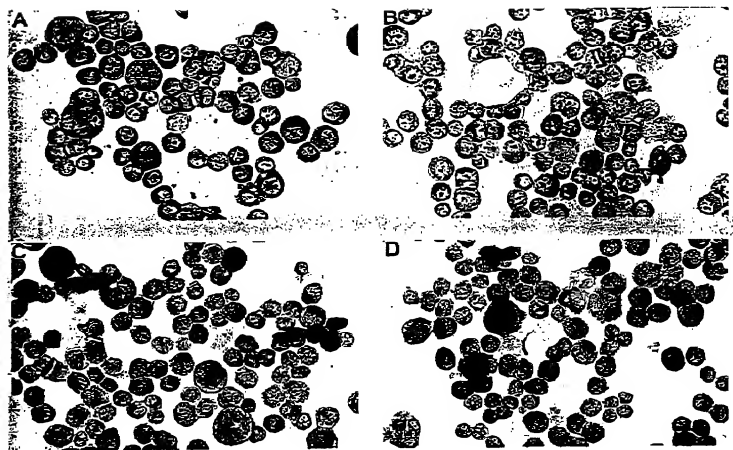
6/16

Figur 6



7/16

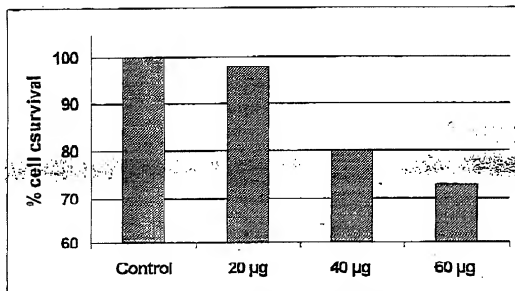
Figur 7



8/16

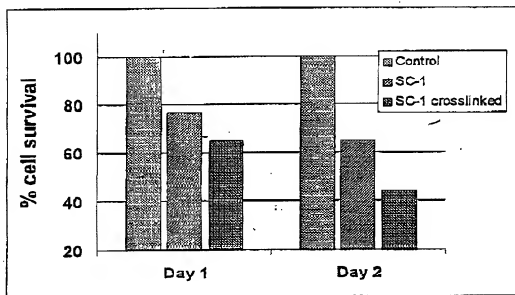
Figur 8

A



Verdünnungsreihe

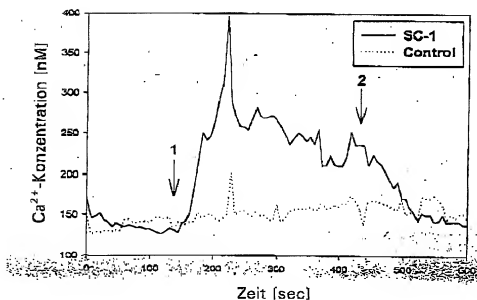
B



Crosslinking

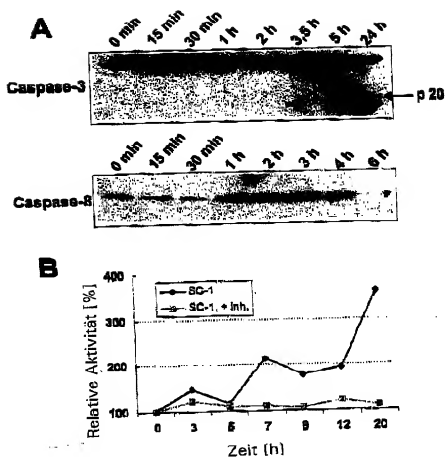
9/16

Figur 9



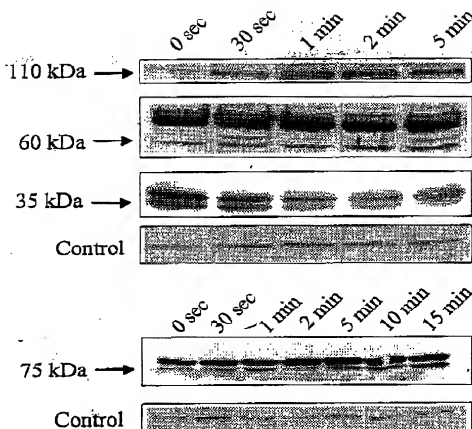
10/16

Figur 10



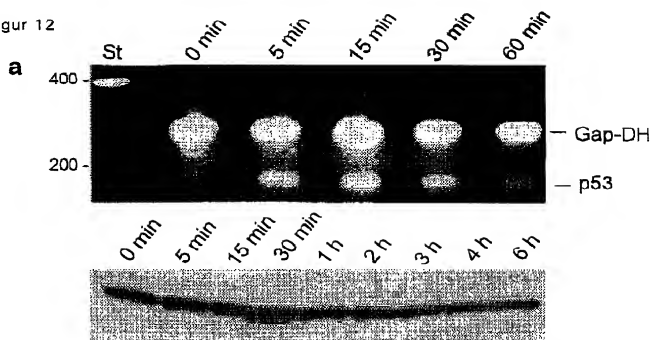
11/16

Figur 11



12/16

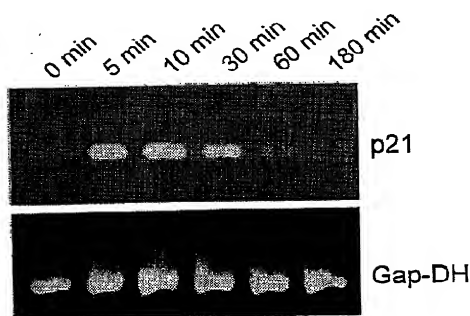
Figur 12



b

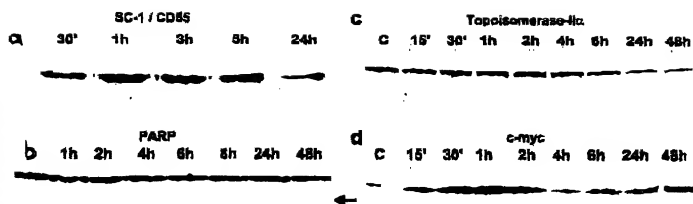
Codon-Nr.	265	270	275
	S G N L L G R N S F E V R V C A C		
WT	AGT GGT AAT CTA CTG GGA CGG AAC AGC TTT GAG GTG CGT GTT TGT GGC TGT		
23132	---	---	---

Figur 13



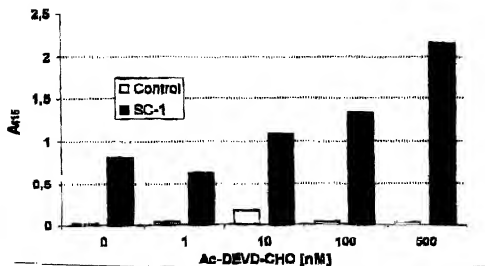
13/16

Figur 14



14/16

Figur 15



15/16

Figur 16



Figur 17

